

L1 ANSWER 1 OF 1 HCAPLUS COPYRIGHT 2002 ACS

ACCESSION NUMBER: 1999:624697 HCAPLUS

DOCUMENT NUMBER: 131:213197

TITLE: Method for the syntheses of 13C- or 14C-labeled linear maltodextrins as well as cyclic maltodextrins through primary reactions via microbial enzymes as well as these microorganisms themselves

INVENTOR(S): Horlacher, Reinhold; Boos, Winfried; Peist, Ralf; Boeck, August; Pajatsch, Markus

PATENT ASSIGNEE(S): Germany

SOURCE: Ger. Offen., 4 pp.

CODEN: GWXXBX

DOCUMENT TYPE: Patent

LANGUAGE: German

INT. PATENT CLASSIF.:

MAIN: C12P019-04

SECONDARY: C12P019-18

CLASSIFICATION: 16-2 (Fermentation and Bioindustrial Chemistry)
Section cross-reference(s): 33

FAMILY ACC. NUM. COUNT: 1

PATENT INFORMATION:

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
DE 19812332	A1	19990923	DE 1998-19812332	19980320 <--

ABSTRACT:

Labeled linear and cyclic maltodextrins are produced from 13C- or 14C-labeled maltose by the actions of recombinant Escherichia coli, of exts. from Klebsiella oxytoca or Thermococcus litoralis, or of microbial amylomaltase, cyclodextrin glucanotransferase, glucokinase, and hexokinase.

SUPPL. TERM: maltodextrin carbon label maltose enzyme bacteria

INDEX TERM: Escherichia coli
(syntheses of 13C- or 14C-labeled linear and cyclic maltodextrins from labeled maltose by microorganisms or their enzymes)

INDEX TERM: 9001-36-9, Glucokinase 9001-51-8, Hexokinase 9030-09-5, Cyclodextrin glucanotransferase 9032-09-1, Amylomaltase
ROLE: CAT (Catalyst use); USES (Uses)

(syntheses of 13C- or 14C-labeled linear and cyclic maltodextrins from labeled maltose by microorganisms or their enzymes)

INDEX TERM: 9050-36-6P, Maltodextrin
ROLE: BMF (Bioindustrial manufacture); BPN (Biosynthetic preparation); BIOL (Biological study); PREP (Preparation)
(13C- or 14C-labeled; syntheses of 13C- or 14C-labeled linear and cyclic maltodextrins from labeled maltose by microorganisms or their enzymes)

INDEX TERM: 69-79-4, Maltose
ROLE: BPR (Biological process); BSU (Biological study, unclassified); RCT (Reactant); BIOL (Biological study); PROC (Process); RACT (Reactant or reagent)
(13C- or 14C-labeled; syntheses of 13C- or 14C-labeled linear and cyclic maltodextrins from labeled maltose by microorganisms or their enzymes)



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 12 332 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁶:
C 12 P 19/04
C 12 P 19/18

②1 Aktenzeichen: 198 12 332.9
②2 Anmeldetag: 20. 3. 98
④3 Offenlegungstag: 23. 9. 99

DE 198 12 332 A 1

⑦1 Anmelder:

Horlacher, Reinhold, 78465 Konstanz, DE; Boos,
Winfried, 78464 Konstanz, DE; Peist, Ralf, 78464
Konstanz, DE; Böck, August, 82269 Geltendorf, DE;
Pajatsch, Markus, 80797 München, DE

⑦2 Erfinder:

gleich Anmelder

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤4 Verfahren zur Synthese von ¹³C- oder ¹⁴C-markierten linearen Maltodextrinen sowie zyklischen Maltodextrinen mittels einfacher Reaktionen durch mikrobielle Enzyme sowie diese Mikroorganismen selbst

⑤7 Verfahren zur Synthese von ¹³C- oder ¹⁴C-markierten linearen Maltodextrinen sowie zyklischen Maltodextrinen mittels einfacher Reaktionen durch mikrobielle Enzyme sowie diese Mikroorganismen selbst.

Die Synthese von markierten, linearen oder zyklischen Maltodextrinen erfolgt bislang hauptsächlich über Begasung von z. B. Algen oder Tabakblättern mit markiertem CO₂ und anschließender Extraktion der gewünschten Produkte. Bedingt durch diese Methode ist die Ausbeute sehr klein und die spezifische Aktivität der Produkte sehr gering. Durch das neue Verfahren der Synthese mittels einfacher enzymatischer Reaktionen erreicht man wesentlich höhere Ausbeuten bei zugleich hoher spezifischer Aktivität der Produkte.

Durch Inkubation gereinigter Enzyme oder Zellextrakte, die die benötigten Enzyme enthalten, und markierter Maltose, entstehen durch enzymatische Reaktionen Maltodextrine unterschiedlicher Kettenlänge. Bei Anwesenheit einer weiteren enzymatischen Aktivität (Cyclodextrin Glucanotransferase) können genügend lange Maltodextrine zyklisiert werden. Die Reaktionsprodukte können mittels einfacher Methoden gereinigt werden. Die Ausbeuten und die spezifische Aktivität der Produkte liegt weit über der der bekannten Verfahren.

Synthese von markierten linearen und zyklischen Maltodextrinen aus Maltose durch enzymatische Reaktionen.

DE 198 12 332 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von ^{13}C - oder ^{14}C -markierten linearen Maltodextrinen sowie zyklischen Maltodextrinen aus ^{13}C - oder ^{14}C -markierter Maltose mittels enzymatischer Reaktionen. Die eingesetzte Maltose wird dabei mit hoher Ausbeute in die Reaktionsprodukte umgesetzt. Die spezifische Aktivität dieser Produkte beträgt dabei mindestens die der eingesetzten Maltose, in der Regel jedoch ein Vielfaches davon. Die Reaktionsprodukte können durch einfache Methoden getrennt und aufgereinigt werden.

Maltodextrine sind Saccharide, welche durch Polymerisation von Glukose entstehen. Man unterscheidet sie je nach Kettenlänge als Maltose ($n = 2$), Maltotriose ($n = 3$) etc. Maltodextrine sind sehr weit verbreitet. Viele Organismen können Maltodextrine als Kohlenstoffquelle nutzen. Zyklische Maltodextrine (Zyklodextrine) entstehen durch Zyklisierung von linearen Maltodextrinen. Auch sie werden anhand ihrer Kettenlänge unterschieden, wobei alpha-Zyklodextrin aus 6 Glukoseeinheiten, beta-Zyklodextrin aus 7 und gamma-Zyklodextrin aus 8 Glukoseeinheiten besteht. Zyklodextrine sind relativ weit verbreitet und werden von zahlreichen Organismen als Kohlenstoffquelle genutzt. Dabei werden die im ringinneren hydrophoben Zyklodextrine durch die Organismen spezifisch aufgenommen. Das hydrophobe Ringinnere der Zyklodextrine kann dabei zum Transport von anderen, kleinen Molekülen in das Zellinnere genutzt werden. Hierzu wird die zu transportierende Substanz im Inneren des Zyklodextrinmoleküls eingeschlossen und gelangt mittels diesem "Carrier" in die Zelle.

Um den Stoffwechsel von Dextrinen in Organismen untersuchen zu können, benötigt man ^{13}C - oder ^{14}C -markierte Ausgangsprodukte. Auch bei der Untersuchung des Verhaltens der Zyklodextrine als "Carrier" z. B. für das Einschleusen von Wirkstoffen benötigt man markierte Substanzen.

Zur Zeit sind im Handel keine ^{13}C - oder ^{14}C -markierten linearen oder zyklischen Maltodextrine erhältlich.

Für die Synthese von ^{13}C - oder ^{14}C -markierten Dextrinen und Zyklodextrinen sind so gut wie keine Verfahren bekannt. Bisher existieren nur einige Verfahren zur Synthese von nicht markierten zyklischen Dextrinen aus linearen Dextrinen. Hier wäre z. B. Vetter, D et al., Carbohydr. Res. 1992 223: 61-69 und Morita, T. et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 1996 56: 311-324 zu nennen. Die Synthese von linearen, markierten Kohlenstoffverbindungen wie Glukose und andere Saccharide erfolgt durch Begasung von z. B. Algen oder Tabakblättern mit markiertem CO_2 und anschließender Extraktion der gewünschten Produkte (Kollman, V.H. et al. Biochem. Biophys. Res. Com. 1973 50: 826-831 und Kollman, V.H. et al. Carbohydr. Res. 1979 73: 193-202).

Diese genannten Verfahren beinhalten gravierende Nachteile. So sind z. B. bei der Synthese mittels Organismen die Ausbeuten trotz hohem Aufwand sehr gering, zahlreiche unerwünschte Nebenprodukte treten auf. Als größtes Manko muß zudem die geringe spezifische Aktivität der isolierten Produkte angesehen werden.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein einfaches, kostengünstiges Verfahren zur Synthese von ^{13}C - oder ^{14}C -markierten linearen und zyklischen Maltodextrinen bereitzustellen, das die Nachteile der bekannten Verfahren, insbesondere die geringen Ausbeuten und die geringe spezifische Aktivität vermeidet.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Gewinnung von ^{13}C - oder ^{14}C -markierten linearen und zyklischen Maltodextrinen aus ^{13}C - oder ^{14}C -markierter Maltose, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die Produkte enzymatisch synthetisiert werden. Dies kann durch gereinigte En-

zyme oder Zellextrakte, welche die Enzymaktivität beinhalten, geschehen. Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Mikroorganismen, die diese Enzyme synthetisieren und gleichzeitig bestimmte Abbauende oder modifizierende Enzyme nicht mehr synthetisieren.

Kern der Erfindung ist eine leicht zu kontrollierende enzymatische Reaktion, die in-vitro zur Synthese von linearen und zyklischen Dextrinen heran gezogen werden kann. Dabei haben die Reaktionsprodukte mindesten die spezifische Aktivität der eingesetzten Maltose, in der Regel aber ein Vielfaches davon.

Der Mikroorganismus, dessen Extrakt oder dessen gereinigte Enzyme zur effektiven Synthese von ^{13}C - oder ^{14}C -markierten linearen oder zyklischen Maltodextrinen herangezogen werden kann, umfaßt in seiner bevorzugten Ausführungsform folgende 6 Hauptmerkmale:

- Alle Gene, die direkt zur Synthese von linearen Maltodextrinen benötigt werden, liegen als kontrolliert exprimierbare Allele vor.
- Die Polymerisierungsreaktion kann wahlweise mit Zellextrakten oder gereinigten Komponenten des Mikroorganismus durchgeführt werden.
- Die zyklisierende Enzymaktivität kann wahlweise in diesem Mikroorganismus kontrolliert expremiert oder in Form eines gereinigten Enzyms eingesetzt werden.
- Unerwünschte enzymatische Nebenreaktionen werden durch Mutationen der entsprechenden kodierenden Gene verhindert.
- Die entstehende markierte Glukose kann durch Glukokinase oder Hexokinase in markierte Glukose-6-Phosphat überführt werden.
- Die Reaktionsprodukte können leicht und spezifisch gereinigt werden.

Ein Ausführungsbeispiel zur Realisierung der Erfindung wird anhand der Synthese von ^{13}C - oder ^{14}C -markierten linearen oder zyklischen Maltodextrinen aus ^{13}C - oder ^{14}C -markierter Maltose mittels Extrakten aus *Escherichia coli* und einer Enzymaktivität aus *Klebsiella oxytoca* bzw. *Thermococcus litoralis* erläutert:

- 1) Der *Escherichia coli* Bakterienstamm trägt das zur Synthese von linearen Maltodextrinen nötigen Gen *malQ* unter seinem Wildtyp-Promotor oder einem anderen regulierbaren Promotor auf dem Chromosom oder einem Plasmid. Als Promotor zur gezielten Expression dient der *tac*-Promotor oder ein anderer regulierbarer Promotor. An Stelle der Enzymaktivität von *Escherichia coli* kann auch eine vergleichbare Enzymaktivität eines anderen Organismus herangezogen werden.
- 2) Durch Mutationen in Genen, welche für die Verwertung Maltodextrinen essentiell sind, wird der Abbau der synthetisierten Maltodextrine verhindert. Dies wird durch eine Mutation in *malP*, *malS*, *malZ* und/oder anderen Genen erreicht. Diese Mutation kann eine Deletion und/oder eine Insertion eines Transposons oder einer Resistenzkassette sein.
- 3) Das Gen für die zyklisierende Enzymaktivität (Cyclodextrin Glukanotransferase) kann in *Escherichia coli* gezielt (induzierbar) expremiert werden oder aus dem jeweiligen Organismus gereinigt werden. Diese Enzymaktivität kann aus *Klebsiella oxytoca*, *Thermococcus litoralis* oder einem anderen Organismus sein.
- 4) Die Synthese aller Produkte erfolgt in-vitro mit Zellextrakt der die jeweiligen Enzyme enthält oder mit den jeweiligen gereinigten, homolog oder heterolog expre-

mierten Enzymen.

5) Die bei der Synthesereaktion frei werdende Glukose kann durch gleichzeitige Inkubation mit Glukokinase oder Hexokinase und ATP in Glukose-6-Phosphat überführt werden. Die entsprechenden Enzyme können 5
entweder gereinigt der Reaktion zugegeben oder in dem Escherichia coli Stamm, welcher zur Herstellung der Extrakte dient, reguliert koexpressiert werden.

10

Patentansprüche

1. Verfahren zur Synthese von ^{13}C - oder ^{14}C -markierten linearen Maltodextrinen und Zyklodextrinen aus ^{13}C - oder ^{14}C -markierter Maltose, **dadurch gekennzeichnet**, daß die eingesetzte Maltose durch enzymatische Reaktionen mit hoher spezifischer Ausbeute zu linearen und zyklischen Dextrinen umgesetzt wird. 15
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß keine unerwünschten enzymatischen Nebenreaktionen die Reaktionsedukte und Reaktionsprodukte verändern. 20
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die spezifische Aktivität der Produkte mindestens die der eingesetzten Maltose entspricht, in der Regel aber ein Vielfaches davon beträgt. 25
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um einfache enzymatische Reaktionen handelt, die sowohl mit Zellextrakten als auch mit gereinigten Enzymen ausgeführt werden können. 30
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es bei den enzymatischen Aktivitäten um eine Amylomaltase (4-alpha-Glucanotransferase) und Cyclodextrin-Glucanotransferase handelt.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine Disproportionierungsreaktion handelt. 35
7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß durch gleichzeitige Inkubation mit Glukokinase oder Hexokinase und ATP zusätzlich markierte Glukose-6-Phosphat entsteht. 40
8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß alle Reaktionsprodukte mit einfachen Mitteln aus dem Reaktionsansatz extrahiert werden können.
9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Enzymen um Proteine aus den Mikroorganismen Escherichia coli, Klebsiella oxytoca oder Thermococcus lithoralis handelt. 45
10. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß dies durch Mutation in den Genen für die Maltodextrin-Phosphorylase und Amylasen (bei Escherichia coli malP, malS und malZ) erzielt wird. 50
11. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Polymerisierungsreaktion und Zyklisierungsreaktion sowohl zeitlich als auch räumlich getrennt ablaufen können. 55
12. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Enzymaktivitäten getrennt in zwei Proteinen als auch vereint in einem Protein vorliegen können. 60
13. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um genetisch stabilen Mutationen handelt.

65